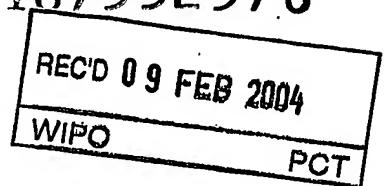


USPTO 25 APR 2005

PCT/EP U S / 11758

BUNDE REPUBLIK DEUTSCHLAND

10/532576



PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

EP 03/11758

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 49 401.0

Anmeldetag: 23. Oktober 2002

Anmelder/Inhaber: Bernina Biosystems GmbH, Planegg/DE

Bezeichnung: Liposomen formende Zusammensetzung

IPC: B 01 J, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 4. November 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Kahle

BEST AVAILABLE COPY

Liposomen formende Zusammensetzung

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Liposomen formende Zusammensetzung, die Verwendung dieser Zusammensetzung zur Formung von Liposomen und Liposomen, erhältlich durch die Verwendung der Liposomen formenden Zusammensetzung.

Liposomen sind künstlich hergestellte uni- oder multilamellare Lipidvesikel, die einen wässrigen Innenraum umschließen. Sie sind im allgemeinen biologischen Membranen ähnlich und werden daher nach Anlagerung an dieselben oftmals leicht in die Membranstruktur integriert oder an die Zellmembran adhäriert. Im ersten Falle wird der Inhalt des Liposomenninnenraums in das von der biologischen Membran umschlossene Lumen entladen. Im zweiten Falle kann der liposomale Inhalt in den Zellzwischenraum entladen werden. So ist z.B. dies eine mögliche Voraussetzung des parazellulären Transportes von Wirkstoffen vom Darm in den Körper durch die Darmwand.

Liposomen werden daher als Transportvehikel für Stoffe, wie z. B. Nukleinsäuren und Pharmazeutika benutzt. So werden Liposomen-haltige Hautcremes hergestellt, die Wirkstoffe zielgerichtet in die Epidermis und tiefer gelegene Zellschichten transportieren. Zur Herstellung von Liposomen werden hauptsächlich natürliche Lecithine aus Sojabohnen oder Eigelb bzw. definierte natürliche oder künstliche Phospholipide, wie Cardiolipin, Sphingomyelin, Lysolecithin und andere verwendet.

Die ersten Liposomen waren allerdings dahingehend nachteilig, dass sie nur eine geringe Stabilität aufwiesen. Aus normalen doppelschicht-bildenden Phospholipiden gebildete Liposomen waren auch im gekühlten Zustand nur kurze Zeit haltbar. Ihre Lagerstabilität lässt sich zwar durch Einbeziehen von Phosphatidsäure erhöhen, jedoch ist die somit verbesserte Stabilität für viele Zwecke immer noch unzureichend. Außerdem waren derartige herkömmliche Liposomen nicht säurestabil und auch nicht ausreichend resistent gegen die Verdauung im Dünndarm und daher weder für den Transport pharmazeutischer Wirkstoffe geeignet, die nach oraler Verabreichung den Magen und den Dünndarm passieren, noch für die Liposomen unterstützte DNA-Transfektion unter leicht sauren pH-Bedingungen.

Es wurden daher Anstrengungen unternommen, um neuartige Liposomen formende Verbindungen aufzufinden. Eine Stoffklasse, die sich dabei als insbesondere vielversprechend erwiesen hat, sind Tetraetherlipidderivate, wie sie beispielsweise aus natürlichen Quellen gewonnen werden können. Daneben gibt es auch eine ganze Reihe an derivatisierten Tetraetherlipidderivaten sowie synthetischen Tetraetherlipidderivaten. Beispielsweise sei hier verwiesen auf die Verbindungen, die in den deutschen Patentanmeldungen 197 36 592.2, 197 58 645.7, 100 65 561.0, 102 04 053.2 und 102 29 438.0 offenbart sind.

Diese Verbindungen zeigen im allgemeinen eine zufriedenstellende Eignung zur Formung von Liposomen, die die eingangs geschilderten Nachteile der herkömmlichen Verbindungen überwinden. Allerdings wurde festgestellt, dass nicht alle der aufgefundenen Tetraetherlipidderivate zur Formung von Liposomen geeignet sind, und dass darüber hinaus die gewünschten Eigenschaftsprofile der Liposomen mit den Tetraetherlipidderivaten nicht erreicht werden konnten.

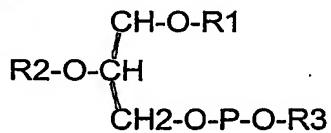
Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Liposomen formende Zusammensetzungen anzugeben, die die sichere Formung von Liposomen erlauben, wobei gleichzeitig eine ausreichende mechanische und chemische Stabilität und damit verlängerte Lagerfähigkeit sichergestellt wird, was eine einfache und verlässliche Anwendbarkeit ermöglicht. Darüber hinaus sollten diese Liposomen formenden Zusammensetzungen eine geeignete Variabilität aufweisen, so dass gewünschte Eigenschaftsprofile gezielt und sicher eingestellt werden können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das Bereitstellen von Liposomen formenden Zusammensetzungen nach Anspruch 1 gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen sind in den Unteransprüchen angegeben. Darüber hinaus stellt die vorliegende Erfindung Liposomen zur Verfügung, erhältlich durch den Einsatz der erfindungsgemäßen Liposomen formenden Zusammensetzung. Schließlich stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung der Liposomen formenden Zusammensetzung zur Formung von Liposomen zur Verfügung. Bevorzugte Ausführungsformen dieser beiden Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung sind in den jeweiligen Unteransprüchen angegeben.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen eignen sich insbesondere zur Formung oral zu verabreichender liposomaler Formulierungen.

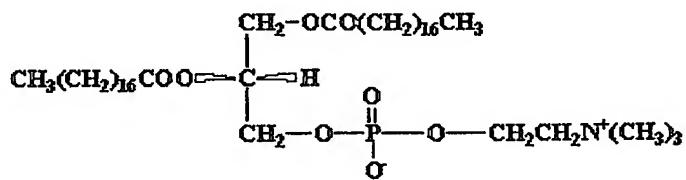
Die erfindungsgemäße Zusammensetzung enthält zwei wesentliche Bestandteile.

Zum einen umfasst die erfindungsgemäße Liposomen formende Zusammensetzung mindestens ein Lipid, das zur Ausformung einer Doppelschicht fähig ist. Derartige Lipide sind dem Fachmann bekannt. Erfindungsgemäß können irgendwelche Lipide eingesetzt werden, die zur Formung einer Doppelschicht fähig sind, wobei diese Lipide aus einer biologischen Quelle gewonnen sein können, oder synthetisch hergestellt sein können. Bevorzugt in diesem Zusammenhang sind Phospholipide der folgenden allgemeinen Formel

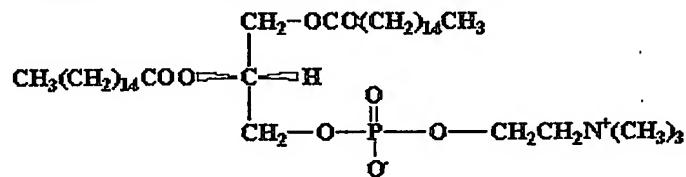


wobei R₁ und R₂ eine aliphatische Kohlenwasserstoffkette, eine Acylgruppe oder einen gesättigten oder ungesättigten Fettsäurerest darstellen. Bevorzugt in diesem Zusammenhang sind Alkylgruppen mit 10 bis 20 Kohlenstoffatomen, Acylgruppen mit 10 bis 20 Kohlenstoffatomen und eine Oleoylgruppe, eine Palmitoleoylgruppe, eine Elaidoylgruppe, eine Linoleylgruppe, Linolenylgruppe, eine Linolenoylgruppe, eine Arachidoylgruppe, eine Vaccinylgruppe, eine Lauroylgruppe, eine Myristoylgruppe, eine Palmitoylgruppe oder eine Stearylgruppe. R₃ ist bevorzugt Wasserstoff, 2-Trimenthylamino-1-Ethyl, 2-Amino-1-Ethyl, C1-C4-Alkyl, C1-C5-Alkyl, substituiert mit einer Carboxygruppe, C2-C5-Alkyl, substituiert mit einer Hydroxylgruppe, C2-C5-Alkyl, substituiert mit einer Carboxylgruppe oder einer Hydroxylgruppe oder C2-C5-Alkyl, substituiert mit einer Carboxylgruppe und einer Aminogruppe, Inositol, Sphingosin oder Salze besagter Substanzen. Als erfindungsgemäßes Lipid können auch Glyceride, isoprenoide Flüssigkeiten, Steroide, Sterine oder Sterole von schwefelhaltigen oder kohlenhydrathaltigen Lipiden eingesetzt werden oder irgendwelche andere doppelschichtformende Lipide, insbesondere halbprotonierte fluide Fettsäuren und ähnliche. Weitere einsetzbare Lipide sind Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylglycerole, Phosphatidylinositole, Phosphatidinsäuren, Phosphatidylserine, Sphingomyeline und andere Sphingophospholipide, Glycosphingolipide, Ganglioside und andere Glycolipide oder synthetische Lipide.

Erfindungsgemäß muss mindestens ein derartiges Lipid vorliegen, das zur Formung einer Doppelschicht fähig ist. Es ist aber auch möglich, zwei oder mehr derartiger Lipide in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung einzusetzen. Durch entsprechende Auswahl, insbesondere der Kopfgruppen, können beispielsweise eine sichere Anlagerung am gewünschten Zielort oder eine sichere Einlagerung eines in das Liposom einzuführenden pharmazeutischen Mittels sichergestellt werden. Besonders bevorzugte doppelschichtformende Lipide sind 1,2-Di-stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (im folgenden DSPC abgekürzt, Formel unten angegeben)



und 1,2-Di-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DPPC)



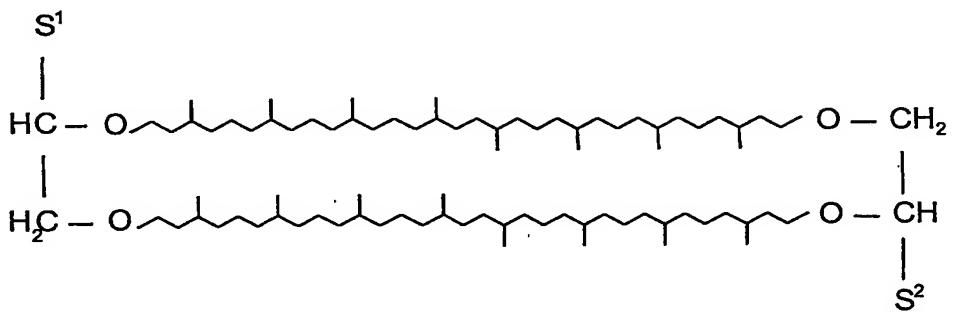
sowie deren natürlichen Analoga Soja-phosphatidylcholin (S-PC, Markennamen: S100, S80 von LIPOID) oder Ei-phosphatidylcholin (Ei-PC), oder hydrogeniertes Soja-phosphatidylcholin (HSPC) und hydrogeniertes Ei-phosphatidylcholin (HEPC).

Die zweite wesentliche Komponente der erfindungsgemäßen Zusammensetzung ist ein Tetraetherlipid, das die durch die erfindungsgemäß eingesetzten Lipide geformte Doppelschicht durchspannt.

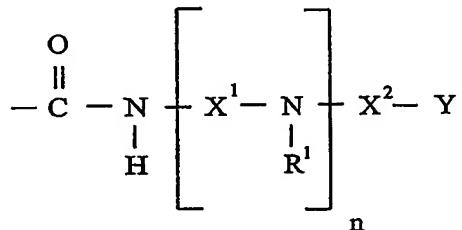
Erfindungsgemäß kann irgendein Tetraetherlipid eingesetzt werden, das dazu geeignet ist, in der durch die beschriebenen Lipide geformten Doppelschicht ein Paar der doppelschichtformenden Lipide zu ersetzen. Bevorzugte Tetraetherlipide sind insbesondere die, die in der WO 99/10337 genannt sind. Darüber hinaus können auch die Tetraetherlipide

eingesetzt werden, die in den eingangs genannten deutschen Patentanmeldungen offen-
bart sind.

Bevorzugte Tetraetherlipide sind welche der folgenden Formel (1):



wobei S^1 und S^2 gleich oder verschieden sein können und jeweils die folgende Bedeutung haben:



Y kann $-\text{NR}^2\text{R}^3$ oder $-\text{N}^+\text{R}^4\text{R}^5\text{R}^6$ bedeuten;

X^1 und X^2 können gleich oder verschieden sein und sind jeweils unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe, die ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkylen oder Alkenylen mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen umfaßt;

R^1 bis R^6 können gleich oder verschieden sein und sind jeweils unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe, die umfaßt: Wasserstoff, verzweigte oder unverzweigte Alkyl-, Alkenyl-, Aralkyl- oder Arylgruppen mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, wobei jeweils einer der

Reste R² bis R⁶ weiter einen Antikörper gegen Zelloberflächenmoleküle oder einen Liganden für Zelloberflächen-Rezeptoren umfassen kann; und

n kann eine ganze Zahl zwischen 0 und 10 bedeuten,

sowie durch Bildung von Pentazyklen im Tetraethergrundgerüst gebildete Modifikationen davon.

In bevorzugten Ausführungsformen sind die Substituenten S¹ und S² an beiden Enden des Tetraetherlipidgrundgerüstes gleich. Dies ermöglicht, ausgehend von natürlichen Tetraetherlipiden, die Synthese ohne zwischenzeitliche Verwendung von Schutzgruppen. Die Identität der Substituenten S¹ und S² ist besonders bevorzugt in solchen Fällen, in denen keiner der Reste R¹ bis R⁶ einen Antikörper oder Liganden für einen Zelloberflächenrezeptor darstellt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäß Tenraetherlipidderivates stellt die Gruppe X¹ sowohl in S¹ als auch in S² ein Alkylen oder Alkenylen mit 2 bis 10, bevorzugt mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen dar. In ganz besonders bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei X¹ um Propylen.

Die Gruppe X² ist ebenfalls bevorzugt ein Alkylen oder Alkenylen mit 2 bis 10, bevorzugt mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen. Auch für X² sind Propylenreste besonders bevorzugt.

n kann 0 bis 10 bedeuten. In bevorzugten Ausführungsformen ist n 0 bis 3, ganz besonders bevorzugt 0.

In weiteren Ausführungsformen des erfindungsgemäß Tenraetherlipidderivates bedeutet Y sowohl in S¹ als auch in S² -NR²R³. Dabei sind R² und R³ bevorzugt Wasserstoff, verzweigte oder unverzweigte Alkyl-, Alkenyl-, Aralkyl- oder Arylgruppen besonders bevorzugt Wasserstoff-, Methyl-, Ethyl- oder Propylgruppen. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform bedeutet Y sowohl in S¹ als auch in S² ein quaternäres Ammoniumsalz, dessen Reste R⁴, R⁵ und R⁶ ebenfalls bevorzugt Wasserstoff-, verzweigte oder unverzweigte Alkyl-, Alkenyl-, Aralkyl- oder Arylgruppen mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, besonders bevorzugt Wasserstoff, Methyl, Ethyl oder Propyl sind. Jeweils einer der Reste

R^2 bis R^6 kann einen Antikörper gegen Zelloberflächenmoleküle oder einen Liganden für Zelloberflächen-Rezeptoren umfassen.

In besonders bevorzugten Ausführungsformen hat das erfindungsgemäße Tetraetherlipid-derivat die allgemeine Formel (I) mit den nachstehend angegebenen Substituenten S^1 -und S^2 :

Verbindung A:

S^1 und S^2 : $-\text{CO-NH-(CH}_2)_3\text{-NH}_2$:

Verbindung B:

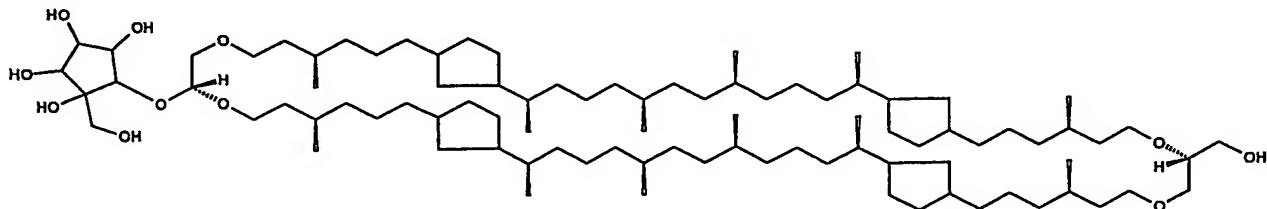
S^1 und S^2 : $-\text{CO-NH-(CH}_2)_3\text{-N(CH}_3)_2$:

Verbindung C:

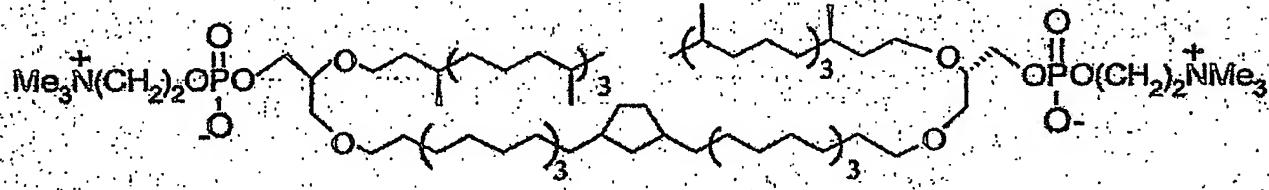
S^1 und S^2 : $-\text{CO-NH-(CH}_2)_3\text{-N}^\oplus(\text{CH}_3)_3$

Erfindungsgemäß zwingend vorgeschrieben ist die Anwesenheit mindestens eines Tetraetherlipids. Jedoch können auch hier wiederum Mischungen verschiedener Tetraetherlipide eingesetzt werden. Wiederum kann durch die geeignete Auswahl der Kopfgruppen das Eigenschaftsprofil der aus der erfindungsgemäßen Zusammensetzung geformten Liposomen so gezielt eingestellt werden, wie bereits oben im Zusammenhang mit den doppelschichtformenden Lipiden beschrieben.

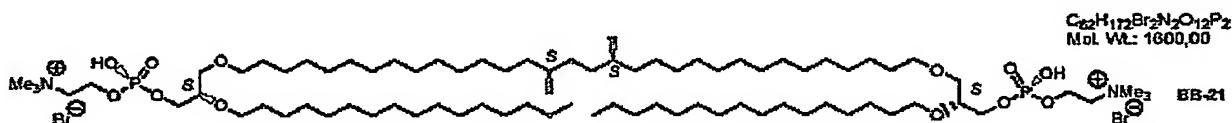
Ein insbesondere bevorzugtes Tetraetherlipid ist ein Glycerolcalditoltetraetherlipid (im folgenden GCTE abgekürzt), dessen Formel unten gezeigt ist.



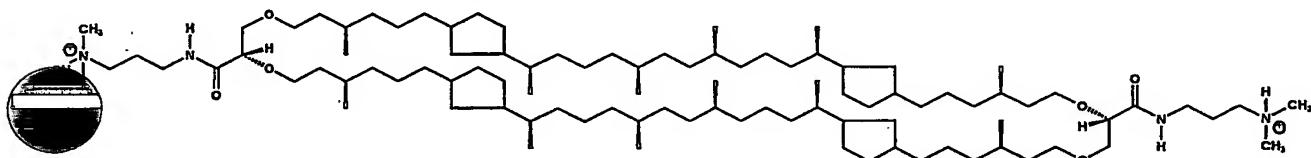
Ein weiteres bevorzugtes Tetraetherlipid ist in der Formel unten gezeigt:



Weitere bevorzugte offenkettige Tetraetherlipide sind die, die in den deutschen Anmeldungen 102 04 053.2 und 102 29 438.0 genannt sind, die hier vollumfänglich durch diesen Verweis mit umfasst sind, wobei insbesondere bevorzugt dabei die folgende Verbindung ist:



Ein Tetraetherlipid, das insbesondere bevorzugt in Kombination mit GCTE eingesetzt wird, ist ein Tetraetherlipid mit kationischen Kopfgruppen, wobei dabei bevorzugt die Verbindung AF1 ist, deren Formel unten gezeigt ist.



Obwohl die erfindungsgemäße Zusammensetzung beliebige Mischungsverhältnisse an doppelschichtformenden Lipiden und Tetraetherlipiden enthalten kann, hat es sich gezeigt, dass es bevorzugt ist, wenn das molare Verhältnis von doppelschichtformendem Lipid zu Tetraetherlipid im Bereich von 1:5 bis 10:1 liegt, stärker bevorzugt im Bereich von 2,5:1 bis 5:1 und am meisten bevorzugt im Bereich von 2,5:1 bis 3,5:1. Liegt dabei zusätzlich noch

ein wie oben definiertes Tetraetherlipid mit kationischen Kopfgruppen vor (wie AF1), so wird vorzugsweise ein molares Verhältnis von doppelschichtformendem Lipid : Tetraetherlipid : Tetraetherlipid mit kationischen Kopfgruppen von (10 bis 4):(2 bis 1):(1bis 0,2) eingestellt, wobei ein Verhältnis von 6:1,5:0,5 insbesondere bevorzugt ist. Eine besonders bevorzugte erfindungsgemäße Kombination ist dabei entweder eine Zusammensetzung aus DSPC und GCTE, mit einem molaren Verhältnis DSPC:GCTE von 3:1 oder eine Zusammensetzung aus DSPC und GCTE und AF1, mit einem molaren Verhältnis DSPC:GCTE:AF1 von 6:1,5:0,5.

Die erfindungsgemäße Liposomen formende Zusammensetzung kann neben den oben beschriebenen wesentlichen Bestandteilen noch zusätzliche Bestandteile enthalten. Diese werden im folgenden beschrieben.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann noch mindestens ein Konservierungsmittel umfassen, bevorzugt ein Mikrobiozid. Dieses wird vorzugsweise ausgewählt unter kurzkettigen Alkoholen, bevorzugt Ethylalkohol und Isopropylalkohol, Chlorbutanol, Benzylalkohol, Chlorbenzylalkohol, Dichlorbenzylalkohol, Hexachlorophen, phenolischen Verbindungen, wie Cresol, 4-Chloro-m-cresol, p-Chloro-m-xylenol, Dichlorophen, Hexachlorophen, Provinoniodid, Parabenen, insbesondere Alkylparabenen, wie Methyl-, Ethyl-, Propyl- oder Butylparaben, Benzylparaben, Säuren, wie Sorbinsäure, Benzoësäure und deren Salze, quartären Ammoniumverbindungen, wie Alkoniumsalzen, z. B. Bromide, Benzalkoniumsalze, wie ein Chlorid oder ein Bromid, Cetrimoniumsalze, wie ein Bromid, Phenoalkezinsalze wie ein Phenododeciniumbromid, Cetylpyridiniumchlorid und andere Salze, Quecksilberverbindungen, wie Phenylquecksilberacetat, -borat oder -nitrat, Thiomersal, Chlorhexidin oder dessen Glukonat oder irgendeine antibiotisch aktive Verbindung biologischer Herkunft oder irgendeine Mischung daraus.

Diese Verbindung wird vorzugsweise in einer solchen Menge zugegeben, dass sie die Menge an Bakterien in Übereinstimmung mit der folgenden Regel verringert: Verringerung der Bakterienmenge bei Zugabe von 1.000.000 Keime pro Gramm Gesamtmasse der Zusammensetzung auf weniger als 100, für den Fall aerober Bakterien, bzw. auf weniger als 10, im Fall von entero-Bakterien, und auf weniger als 1, im Fall von Pseudomonas aeruginosa oder Staphilococcus aureus, nach 4 Tagen. Bevorzugt wird diese Verbindung jedoch

in einer Menge zugegeben, so dass diese Reduzierung nach 3 Tagen und am stärksten bevorzugt nach einem Tag erreicht wird.

Im Hinblick auf einzelne Verbindungen sind die im folgenden angegebenen Mengen im allgemeinen geeignet, eine derartige Reduzierung zu erreichen.

Kurzkettige Alkohole, bevorzugt Ethylalkohol, Propylalkohol, Butylalkohol oder Benzylalkohol: bis zu 10 Gew.-% stärker bevorzugt bis zu 5 Gew.-% und am meisten bevorzugt im Bereich zwischen 0,5 und 3 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtzusammensetzung, wobei für Chlorobutanol ein Bereich von 0,3 bis 0,6 Gew.-% insbesondere bevorzugt ist;

Parabene, insbesondere Methylparaben: 0,05 bis 0,2 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtzusammensetzung, und für Propylparaben insbesondere bevorzugt 0,002 bis 0,02 Gew.-%;

Sorbinsäure: 0,05 bis 0,2 Gew.-%, Benzoësäure, 0,1 bis 0,5 Gew.-%;

Phenole, Trichlosan: 0,1 bis 0,3 Gew.-%;

Chlorhexidin: 0,01 bis 0,05 Gew.-%, jeweils bezogen auf die Gesamtzusammensetzung.

Ein weiterer zusätzlicher Bestandteil der erfindungsgemäßen Zusammensetzung kann ein Antioxidationsmittel sein. Erfindungsgemäß kann irgendein Antioxidationsmittel eingesetzt werden, das verträglich mit den wesentlichen Komponenten der erfindungsgemäßen Zusammensetzung ist.

Das mindestens eine Antioxidationsmittel wird bevorzugt in eine Menge eingesetzt, die den Oxidationsindex auf weniger als 100 % pro 6 Monate reduziert, vorzugsweise wird der Anstieg des Oxidationsindex auf weniger als 100 % pro 12 Monate und insbesondere bevorzugt auf weniger als 50 % pro 12 Monate reduziert. Das erfindungsgemäß eingesetzte Antioxidationsmittel kann aus der folgenden Gruppe ausgewählt werden:

Synthetische phenolische Antioxidationsmittel, wie butyliertes Hydroxyanisol (BHA), butyliertes Hydroxytoluol (BHT) und Di-t-Butylphenol (LY178002, LY256548, HWA-131, BF-389, CE-986, PD-127443, E-5119, BI-L-239XX), tertiäres Butylhydrochinon (TBHQ), Pro-

pylgaleat (PG), 1-O-Hexyl-2,3,5-Trimethylhydrochinon (HTHQ), aromatische Amine (Diphenylamin, p-Alkylthio-o-Anisidin, Ethylendiaminderivate, Carbazol, Tetrahydroindenoindol), Phenole und phenolische Säuren (Guaiacol, Hydrochinon, Vanillin, Gallussäuren und ihre Ester, Protocatechuinsäure, Chininsäure, Syringasäure, Ellaginsäure, Salicylsäure, Nordanhydroguaiaritinsäure (NDGA) Eugenol); Tocopherole (einschließlich Tocopherol (Alpha, Beta; Gamma; Delta) und ihre Derivate, wie Tocopherylacylat (z. B. -acetat, -laurat, -myristat, -palmitat, -oleat, -linoleat usw. oder irgendein anderes geeignetes Tocopheryllipoat), Tocopheryl-POE-Succinat; Trolox und korrespondierende Amidverbindungen und Thiocaboxamidaloge; Ascorbinsäure und dessen Salze, Isoascorbat, (2 oder 3 oder 6)-o-Alkylascorbinsäuren, Ascorbinester (z. B. 6-o-Lauroyl-, Myristoyl-, Palmitoyl-, Oleyl- oder Stearyl-L-Ascorbinsäure usw.); nicht-steroidale entzündungshemmende Mittel (NSAID) wie Indomethacin, Diclotenac, Metenaminsäure, Flutenaminsäure, Phenylbutazon, Oxyphenbutazon, Acetylsalicylsäure, Naproxen, Diflunisal, Ibuprofen, Ketoprofen, Piroxicam, Penicilamin, Penicilamindisulphid, Primaquin, Quinacrin, Chloroquin, Hydroxychloroquin, Acatioprin, Phenobarbital, Acetaminphen), Aminosalicylsäuren und Derivate; Methotrexat, Probucon, antiarrythmetische Mittel, (Amiodaron, Apridin, Asocainol), Ambroxol, Tamoxifen, β -Hydroxytamoxifen; Calciumantagonisten (Nifedipin, Nisoldipin, Nimodipin, Nicardipin, Nilvadipin); Betarezeptorblocker (Atenolol, Propanolol, Nepivolol), Natriumbisulfit, Natriummetabsulfit, Thioharnstoff; Chelatisierungsmittel, wie EDTA, GDTA, Desferral; verschiedene endogene Verteidigungssysteme, wie Transferrin, Lactoferrin, Ferritin, Cearuoplasmin, Haptoglobin, Haemopexin, Albumin, Glukose, Ubichinol-10); enzymatische Antioxidationsmittel, wie Superoxidismutase und Metallkomplexe mit einer ähnlichen Aktivität, einschließlich Catalase, Glutathionperoxidase, und weniger komplexe Moleküle, wie Beta-Caroten, Bilirubin, Harnsäure, Flavonoide (Flavone, Flavonole, Flavonone, Flavanonale, Chacone, Anthocyanine), N-Acetylcystein, Mesna, Glutathion, Thiohistidinderivate, Triazole; Tannine, Zimtsäure, Hydroxyzimtsäure und deren Ester (Coumarinsäure und Ester, Caffeinsäure und Ester, Ferulasäure (Iso-)Chlorogensäure, Sinapinsäure); Gewürzextrakte (z. B. aus Gewürznelken, Zimt, Salbei, Rosmarin, Muskatblüten, Oregano, Nelkenpfeffer, Muskatnuss); Carnosinsäure, Carnosol, Carsolinsäure; Rosmarinsäure, Rosamridiphenol, Gentisinsäure, Ferulinsäure; Hafermehlextrakte, wie Avenathramid 1 und 2, Thioether, Dithioether, Sulfoxide, Tetraalcylthiuramdisulfide; Phytinsäure, Steroidderivate (z. B. U74006F); Tryptophanmetabolite (z. B. 3-Hydroxykynurenin, 3-Hydroxyanthranilsäure); und Organochalcogenide.

Obwohl die Menge an Antioxidationsmittel von den jeweiligen Formulierungen der erfindungsgemäßen Zusammensetzung abhängt, können für einige der bevorzugten Antioxidationsmittel allgemeine Bereiche angegeben werden, in denen die erwünschte Keimreduktion erhalten werden kann. Diese Konzentration beträgt für BHA oder BHT von 0,001 bis 2 Gew.-% stärker bevorzugt zwischen 0,025 und 0,2 Gew.-% und am meisten bevorzugt zwischen 0,005 und 0,02 Gew.-%, jeweils bezogen auf die Gesamtzusammensetzung, für TBHQ und PG zwischen 0,01 und 2 Gew.-%, stärker bevorzugt zwischen 0,005 und 0,2 Gew.-% und am meisten bevorzugt zwischen 0,01 und 0,02 Gew.-%, für die Tocophyrole zwischen 0,005 und 5 Gew.-%, stärker bevorzugt zwischen 0,01 und 0,5 Gew.-% und am meisten bevorzugt zwischen 0,05 und 0,075 Gew.-%, für Ascorbinsäureester zwischen 0,001 und 5 Gew.-%, stärker bevorzugt zwischen 0,005 und 0,5 Gew.-% und am meisten bevorzugt zwischen 0,01 und 0,15 Gew.-%, für Ascorbinsäure zwischen 0,001 und 5 Gew.-%, stärker bevorzugt zwischen 0,005 und 0,5 Gew.-% und am meisten bevorzugt zwischen 0,01 und 0,1 Gew.-%, für Natriumbisulfit oder Natriummetabisulfit zwischen 0,001 und 5 Gew.-%, stärker bevorzugt zwischen 0,005 und 0,5 Gew.-% und am meisten bevorzugt zwischen 0,01 und 0,15 Gew.-%, für Thiohamstoff zwischen 0,0001 und 2 Gew.-%, stärker bevorzugt zwischen 0,0005 und 0,2 Gew.-% und am meisten bevorzugt zwischen 0,001 und 0,01 Gew.-%, typischerweise 0,005 Gew.-%, für Zystein zwischen 0,01 und 5 Gew.-%, stärker bevorzugt zwischen 0,05 und 2 Gew.-% und am meisten bevorzugt zwischen 0,1 und 1,0 Gew.-%, typischerweise 0,5 Gew.-%, für Monotioglycerol zwischen 0,01 und 5 Gew.-%, stärker bevorzugt zwischen 0,05 und 2 Gew.-% und am meisten bevorzugt zwischen 0,1 und 1,0 Gew.-%, typischerweise 0,5 Gew.-%, für NDGA zwischen 0,0005 und 2 Gew.-%, stärker bevorzugt zwischen 0,001 und 0,2 Gew.-% und am meisten bevorzugt zwischen 0,005 und 0,002 Gew.-%, typischerweise 0,01 Gew.-%, für Glutation zwischen 0,005 und 5 Gew.-%, stärker bevorzugt zwischen 0,01 und 0,5 Gew.-% und am meisten bevorzugt zwischen 0,05 und 0,2 Gew.-%, typischerweise 0,1 Gew.-%, für EDTA zwischen 0,001 und 5 Gew.-%, stärker bevorzugt zwischen 0,005 und 0,5 Gew.-% und am meisten bevorzugt zwischen 0,01 und 0,2 Gew.-%, typischerweise zwischen 0,05 und 0,075 Gew.-%, für Zitronensäure zwischen 0,001 und 5 Gew.-%, stärker bevorzugt zwischen 0,005 und 3 Gew.-% und am meisten bevorzugt zwischen 0,01 und 0,2 Gew.-%, typischerweise zwischen 0,3 und 2 Gew.-%, jeweils bezogen auf die Gesamtzusammensetzung.

Ein weiterer optionaler Bestandteil der erfindungsgemäßen Zusammensetzung ist ein Konsistenzgeber. Ein Konsistenzgeber ist eine Verbindung, die die Quellrate der erfindungs-

gemäßigen Zusammensetzung beeinflussen kann. Bevorzugt werden in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung Konsistenzgeber eingesetzt, die die Quellrate vom trockenen Zustand zum Zustand der vollständigen Solvatation mindestens um den Faktor 10 erhöhen.

Derartige Konsistenzgeber sind in der Technik bekannt und umfassen insbesondere pharmazeutisch akzeptable hydrophile Polymere, wie teilweise veretherte Cellulosederivate, umfassend Caboxymethylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Hydroxymethylcellulose oder Methylcellulose, vollständig synthetische hydrophile Polymere, umfassend Polyacrylate, Polymethacrylate, Polyhydroxyethylmethacrylate, Polyhydroxypropylmethacrylate, Polyhydroxypropylmethylacrylate, Polyacrylonitril, Methallylsulfonat, Polyethylene, Polyoxyethylene, Polyethylenglycole, Polyethylenglycoldiactid, Polyethylenglycoldiacrylat, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohole, Polypropylmethacrylamid, Polypropylentumarat-co-Ethylenglycol, Polyoxamere, Polyaspartamid, Hydrazinvernetzte Hyaluronsäure, Silikon, natürliche Gummi, umfassend Alginate, Carageenan, Guargummi, Gelatine, Tragacanth, Pektin, Xanthan, Chitosan, Collagen, Agarose, Mischungen daraus und Derivate oder Copolymere davon.

Diese Konsistenzgeber können einzeln oder in Mischung eingesetzt werden und werden bevorzugt in einer Menge von 0,05 bis 10 Gew.-% eingesetzt, bezogen auf die Gesamtzusammensetzung, stärker bevorzugt von 0,1 bis 5 Gew.-% stärker bevorzugt von 0,25 bis 3,5 Gew.-% und am meisten bevorzugt im Bereich von 0,5 bis 2 Gew.-%.

Oben den oben genannten weiteren optionalen Bestandteilen kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung noch zusätzliche Aditive enthalten, wie Kryoschutzstoffe, Rieselhilfen, Quellungshilfen, Stabilisatoren, Farbstoffe usw. solange diese Stoffe die erfindungsgemäße Zusammensetzung nicht nachteilig beeinträchtigen.

Die oben beschriebene erfindungsgemäße Zusammensetzung eignet sich zur Formung von Liposomen. Diese können beispielsweise dadurch geformt werden, dass die erfindungsgemäße Zusammensetzung in einem physiologisch akzeptablen Puffer suspendiert wird, wie einem Phosphatpuffer, einem Citratpuffer, einem Acetatpuffer oder ähnlichem. Die Molarität des Puffers liegt im Bereich von 10 mM bis 1.000 mM, der pH-Wert ist bevorzugt im Bereich zwischen 2 und 9 und stärker bevorzugt im Bereich zwischen 3 und 6. Die notwendigen Verfahrensschritte zur Formung von Liposomen sind dem Fachmann bekannt. Durch Varia-

- tion des Verfahrens zur Herstellung der Liposomen unter Einsatz der Liposomen formenden Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung können Liposomen einer variablen Größe erhalten werden, wie von 60 bis 1.200 nm, bevorzugt von 100 bis 1.000 nm.

Die Formulierungen, die die oben beschriebenen Liposomen enthalten, können in verschiedener Art und Weise vorliegen; je nach beabsichtigter Verabreichungsweise. Beispiele derartiger Formulierungen sind z. B. lyophilisierte Zusammensetzungen, erhalten durch das Lyophilisieren der oben beschriebenen, in einem Puffer suspendierten Zusammensetzungen, wobei diese Lyophilisate in unterschiedlicher Art und Weise weiter verarbeitet werden können. Beispiele einer solchen Weiterverarbeitung ist die Einführung in eine harte Gelatinkapsel, die Formung zu einer Tablette, insbesondere zu einer Tablette mit einer säurewiderstandsfähigen Beschichtung.

Die so hergestellten Liposomen eignen sich insbesondere zum Transport von Wirkstoffen auf Peptidbasis, wobei diese Wirkstoffe bevorzugt Peptide mit einem Molekulargewicht im Bereich von 200 bis 100.000 Da sind, wie Parathyroidhormon, Lachscalcitonin, GCSF, Octreotid, hGH, Insulin und ähnliche. Insbesondere bevorzugte Wirkstoffe, die mit den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen zu Wirkstoff enthaltenden Liposomen formuliert werden können, sind Octreotid, Calcitonin, Parathyroidhormon und Somatropin.

Die in die Liposomen einzubringenden Wirkstoffe können entweder ursprünglich schon in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung vorliegen oder können bei der Formung der Liposomen zugesetzt werden. Die Menge an Wirkstoff, die in den jeweiligen Formulierungen eingesetzt wird, kann selbstverständlich in Abhängigkeit vom erwünschten Einsatzzweck variieren. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass besonders stabile und effiziente Wirkstoff enthaltende Liposomen erhalten werden können, wenn das Verhältnis zwischen der Gesamtmolarität an Lipid und Tetraetherlipid zur Masse des Wirkstoffs im Bereich von 0,01 bis 0,2 Mikromol/Mikrogramm, stärker bevorzugt im Bereich von 0,03 Mikromol/Mikrogramm bis 0,15 Mikromol/Mikrogramm und am meisten bevorzugt zwischen 0,05 Mikromol/Mikrogramm und 0,1 Mikromol/Mikrogramm liegt.

Die oben angegebenen bevorzugten Werte für das Verhältnis von Gesamtlipid zu Wirkstoff demonstrieren einen weiteren Vorzug der vorliegenden Erfindung. Insbesondere bei oraler Gabe ermöglichen die Zusammensetzungen der Erfindung eine orale Verfügbarkeit der

Wirkstoffe, die auch über das Verhältnis von Gesamtlipid zu Wirkstoff (bevorzugt Peptidwirkstoff) gesteuert werden kann. Die oben genannten Werte zeigen, im Hinblick auf aus konventionellen Lipiden geformten Formulierungen, dass bei erfindungsgemäßer Verwendung der Mischung aus Doppelschicht formendem Lipid und Doppelschicht überspannendem Tetraetherlipid weniger Gesamtlipidanteil notwendig ist, um eine gute orale Verfügbarkeit zu erreichen. Die nachfolgenden Versuche demonstrieren diesbezüglich, dass die bei einem Einsatz von DPPC weniger Gesamtlipid notwendig ist als bei einem Einsatz von DSPC, bei gleichem Verhältnis von Doppelschicht formendem Lipid zu Doppelschicht überspannendem Tetraetherlipid, wobei jedoch auch bei einem Einsatz von DSPC eine stärkere Erhöhung der oralen Verfügbarkeit erhalten wird als bei konventionellen Zusammensetzung.

Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert:

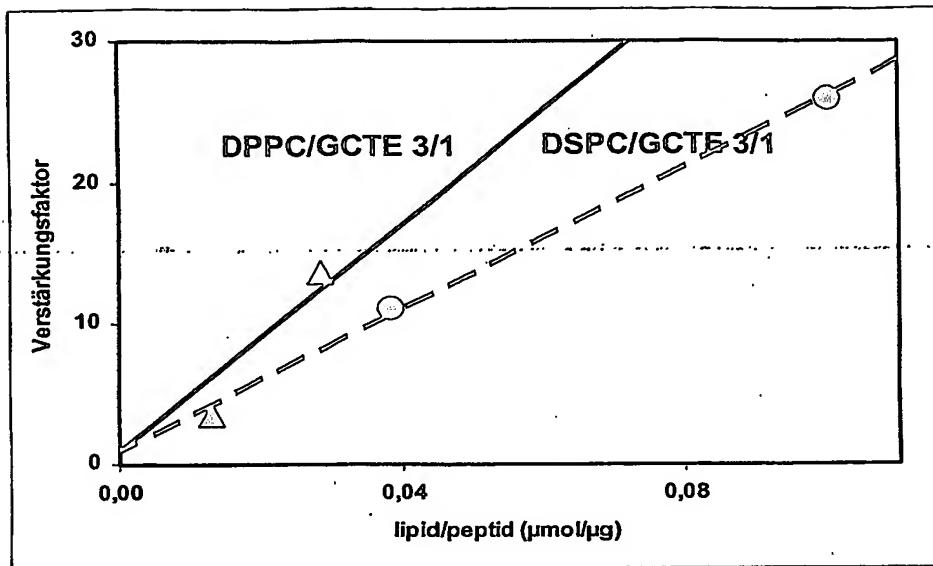
Die Bestimmung der Bioverfügbarkeit von liposomal verabreichten Octreotide *per os* in Ratten erfolgt in konventioneller Weise zum Beispiel wie unten beschrieben.

Wistar Ratten (mit etwa 250 g Körpergewicht) fasten 12 Stunden und erhalten per Schlundsonde 0.5 mL der wässrigen Mischung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung, so dass die verabreichte Menge Octreotid 100 µg pro Tier beträgt. Als Vergleichsprobe werden 100 µg freies Octreotid in 0.5 mL PBS gelöst und per Schlundsonde verabreicht. Blutproben werden nach 30, 60, 120, 240 min retroorbital genommen. Als Kontrolle dient eine i.v. Injektion von 2 µg Octreotide pro Tier um die absolute Bioverfügbarkeit zu bestimmen. Ge-
sessen wurde für freies Octreotid eine absolute Bioverfügbarkeit von 0.5%. Für jede Formulierung wurden 6 Tiere getestet.

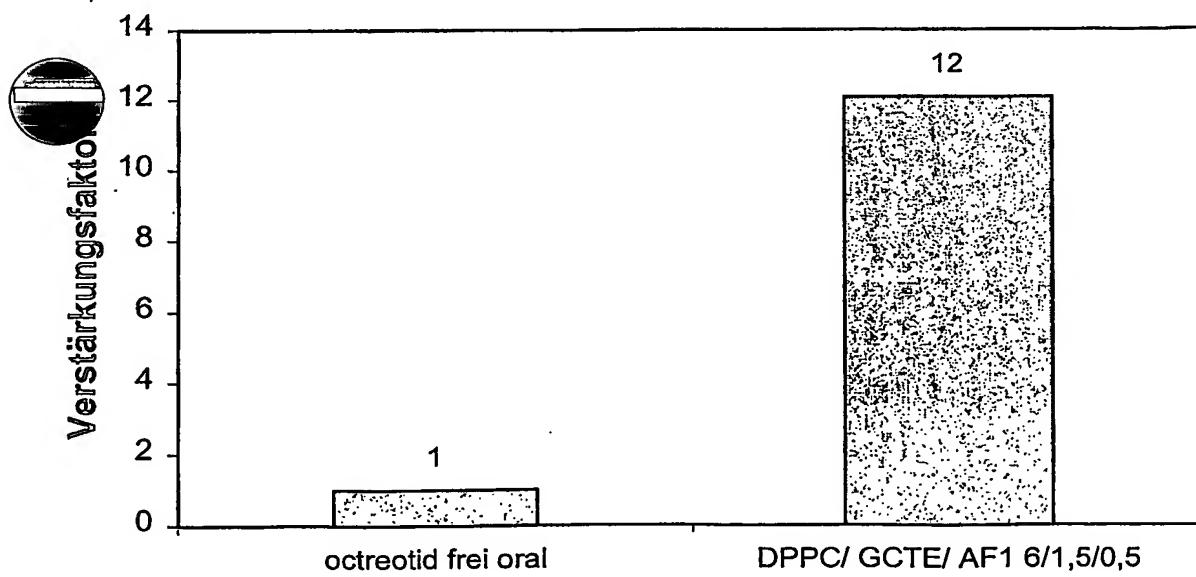
Beispiel 1: orale Gabe von Octreotid mit Liposomen mit der Zusammensetzung aus DSPC und GCTE, mit einem molaren Verhältnis DSPC:GCTE von 3:1 und einem Verhältnis von der Molarität des Gesamtlipides zur Masse des Peptides von 0,097 µmol/µg sowie 0,038 µmol/µg und orale Gabe von Octreotid mit Liposomen mit der Zusammensetzung aus DPPC und GCTE, mit einem molaren Verhältnis DPPC:GCTE von 3:1 und einem Verhältnis von der Molarität des Gesamtlipides zur Masse des Peptides von 0,013 µmol/µg und 0,029 µmol/µg. Der respektiven Verstärkungsfaktoren der absoluten Bioverfügbarkeit und die absolute Bioverfügbarkeit sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Octreotid oral Dosis 0,1mg / Tier	Lipid / peptid (µmol/µg)	Abs. Bioverfüg- barkeit (%)	Verstärkungsfaktor
Frei	0	0,5	1
DSPC / GCTE 3/1	0,038	1,8	3,6
DPPC / GCTE 3/1	0,097	6,8	13,7
DSPC / GCTE 3/1	0,013	5,6	11,2
DSPC / GCTE 3/1	0,029	12,9	25,9

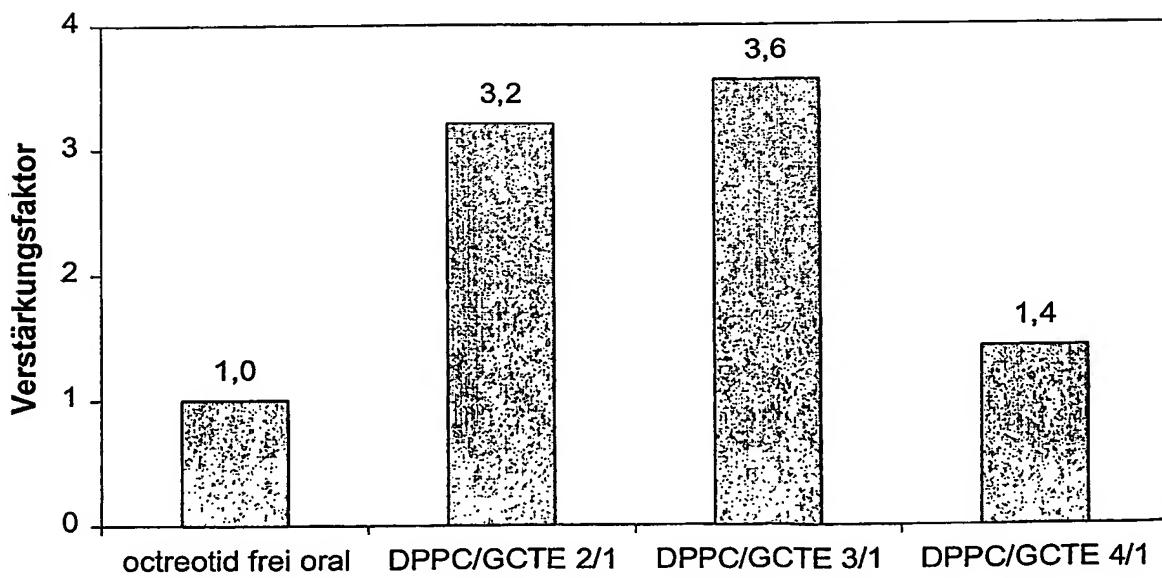
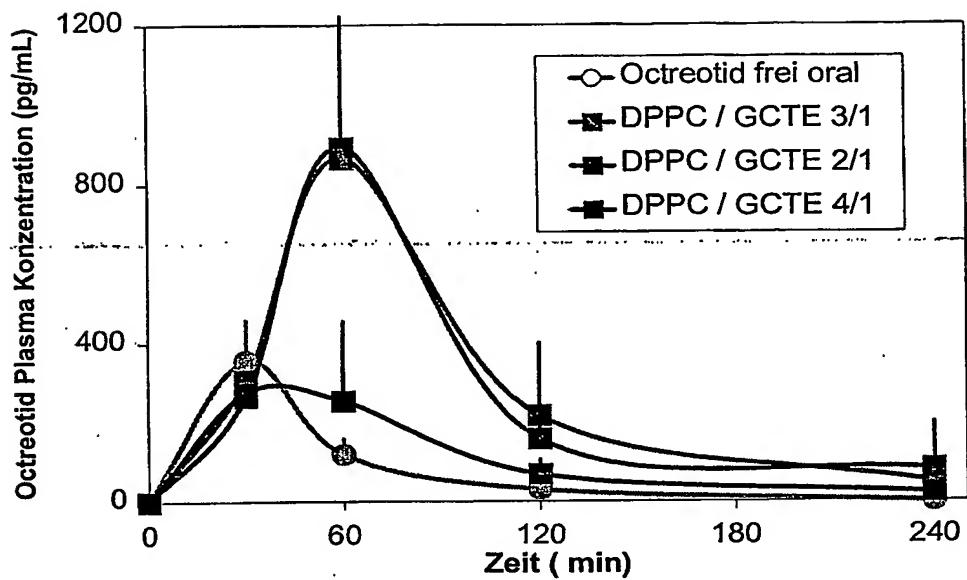
Diese Ergebnisse sind in der folgenden Graphik zusammengefasst.



Beispiel 2: orale Gabe von Octreotid mit Liposomen mit der Zusammensetzung aus DSPC und GCTE und AF1, mit einem molaren Verhältnis DSPC:GCTE:AF1 von 6:1.5:0.5 und einem Verhältnis von der Molarität des Gesamtlipides zur Masse des Peptides von 0,081 $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$. Der Verstärkungsfaktor der absoluten Bioverfügbarkeit von Octreotid in dieser Mischung gegenüber der absoluten Bioverfügbarkeit von freiem Octreotid beträgt 12 und die absolute Bioverfügbarkeit beträgt 6%. Diese Ergebnisse sind in der folgenden Graphik zusammengefasst.



Beispiel 3: orale Gabe von Octreotid mit Liposomen mit der Zusammensetzung aus DPPC und GCTE, mit einem molaren Verhältnis DPPC:GCTE von 3:1 und einem Verhältnis von der Molarität des Gesamtlipides zur Masse des Peptides von 0,013 µmol/µg; mit einem molaren Verhältnis DPPC:GCTE von 2:1 und einem Verhältnis von der Molarität des Gesamtlipides zur Masse des Peptides von 0,007 µmol/µg, und mit einem molaren Verhältnis DPPC:GCTE von 4:1 und einem Verhältnis von der Molarität des Gesamtlipides zur Masse des Peptides von 0,011 µmol/µg. Der Verstärkungsfaktor der absoluten Bioverfügbarkeit von Octreotid in dieser Mischung gegenüber der absoluten Bioverfügbarkeit von freiem Octreotid beträgt 3.6; 3.2 und 1.6 und die absolute Bioverfügbarkeit beträgt 7.2%, 6.4% und 2%. Diese Ergebnisse sind in den folgenden Graphiken zusammengefasst.



• **Patentansprüche**

1. Liposomen formende Zusammensetzung, enthaltend mindestens ein Lipid, das zur Ausbildung einer Doppelschicht fähig ist, und Tetraetherlipid, das die Doppelschicht überspannt.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, weiter enthaltend mindestens ein Antioxidationsmittel und/oder mindestens ein Konservierungsmittel und/oder einen Konsistenzgeber.

Zusammensetzung nach einem der zuvorgenannten Ansprüche, weiter enthaltend einen pharmazeutischen Wirkstoff.

4. Zusammensetzung nach Anspruch 3, wobei der pharmazeutische Wirkstoff ein Peptidwirkstoff ist.
5. Zusammensetzung nach einem der zuvor genannten Ansprüche, wobei das molare Verhältnis von Lipid zu Tetraetherlipid im Bereich von 2,5:1 bis 5:1 liegt.
6. Zusammensetzung nach einem der zuvor genannten Ansprüche, wobei das Lipid DSPC oder DPPC ist und das Tetraetherlipid GCTE ist.

Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Lipid DSPC ist und das Tetraetherlipid eine Mischung aus GCTE und AF1 ist.

8. Verwendung der Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Formung von Liposomen.
9. Liposomen, erhältlich durch Suspendierung einer Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 7 in einem wässrigen Medium.
10. Liposomen nach Anspruch 9, wobei die Liposomen einen Peptidwirkstoff enthalten.

- 11. Liposomen nach Anspruch 10, wobei das Verhältnis zwischen der Gesamtmolarität an Lipid und Tetralipid zur Masse des Peptidwirkstoffes im Bereich von 0,005 bis 0,2 Mikromol/Mikrogramm liegt.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Liposomen formende Zusammensetzungen; damit hergestellte Liposomen sowie die Verwendung der Liposomen formenden Zusammensetzung zur Herstellung von Liposomen.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.